

☎ : 0033 (0)169922672
🖷 : 0033 (0)169922674
💻 : www.sordalab.com
@ : sordalab@wanadoo.fr

KIT MUTAGENESE – effet des UV sur la levure Ade2-
REF : SMP, SMAC ou SMC

A RECEPTION DU COLIS :

☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous en page 2

☑ **Stockage** dans des conditions différentes selon la version du kit :

Pour la version en poudre :

Stocker la boîte de pétri noté « Y » contenant la souche à 🌡 **+4°C** 🌡 couvercle vers le bas
(conservation pendant 10 jours, mais repiquage conseillé:voir p 5-6)
Stocker le sachet noté « pour milieu complet gélifié » à 🌡 **température ambiante** 🌡 (conservation pendant 1 an)

Pour la version à couler :

Stocker la boîte de pétri noté « Y » contenant la souche à 🌡 **+4°C** 🌡 couvercle vers le bas
(conservation pendant 10 jours, mais repiquage conseillé:voir p 5-6)
Stocker les bouteilles à 🌡 **température ambiante** 🌡 (conservation pendant 1 an)

Pour la version coulée :

Stocker la boîte de pétri noté « Y » contenant la souche et les boîtes de pétri coulées à 🌡 **+4°C** 🌡 couvercle vers le bas
(conservation pendant 10 jours, mais repiquage conseillé:voir p 5-6)
Stocker les sachets de boîtes de pétri coulées **couvercle vers le bas** à 🌡 **+4°C** 🌡 (conservation pendant 1 mois)

☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité** en page 21

COMPOSITION DU COLIS :

- 1 boîte de pétri notée « Y » ensemencée de la souche de levures *Saccharomyces cerevisae* Ade2-
- 3 versions différentes :
  - En poudre :
    1 sachet noté « pour milieu complet gélifié » contenant 3 sachets :
    - 1 sachet noté « agar » contenant 40 g d'agar
    - 1 sachet noté « glucose » contenant 60g de glucose
    - 1 sachet noté « extrait levures + peptone » contenant 20g d'extrait de levure et 20g de peptone
  - A couler :
    - 6 bouteilles notées YPD contenant chacune 400 mL de YPD (Yeast extract + Peptone + Glucose + agar)
    - 1 flacon de 175 mL d'eau stérile noté « eau stérile »
  - Coulée :
    - 5 sachets 20 boîtes de milieu complet YPD (Yeast extract + Peptone + Glucose + agar)
    - 1 flacon de 175 mL d'eau stérile noté « eau stérile »

- Option « matériel » pour 40 élèves soit 20 binômes:
  Sachet contenant :
  - 70 compte-gouttes stériles de 3 mL (goutte 40 microL)
  - 45 étaleurs stériles
  - 45 tubes stériles de 5 mL
  - 10 pipettes stériles de 5 mL
  - 5 cure-dents stériles
  - 1 lame de dénombrement KOVA
  - 2 tubes stériles de 50 mL
  - 4 tubes stériles de 10 mL
  - 1 flacon de 250 mL pour la dilution suspension B

- Option « boîte de pétri » pour 40 élèves soit 20 binômes :
  100 boîtes de pétri stériles

MATERIEL NECESSAIRE :

Pour toutes les versions du kit :
- Microscope (*ref 74800 dans la partie observation du catalogue*)
- Récipient d'au moins 2 L (*ex : bidon de 5L : ref DPHD5*)
- Matériel de l'option « matériel » (voir description en page 2)
- Boîte à irradiation UV C (*ref IR dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
- Feutres permanents (*ref FLMP dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
- Bec bensun (*ref BCB1 ou BCB2*), électrique (*ref TECBEC, LAB2 ou LAB3*) ou hotte à flux

Pour la version en poudre du kit :
- Flacons de 500 mL en verre (*ref FGV500 dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*) ou en plastique résistant à l'autoclave (*ref PP5 dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
- Autoclave *(ref AUTOCL ou MICR dans la partie matériel de laboratoire du catalogue)*
- Balance (*ref BAL1 dans la partie matériel de laboratoire du catalogue)*
- Eau stérile

Pour la version à couler du kit :
- Micro-ondes ou bain-marie (*ref AQUATERM dans la partie matériel de laboratoire du catalogue)*

Pour les versions à couler ou en poudre :
- Gants anti-chaleur (*ref GCHAL dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
- Boîtes de pétri de l'option « boîte de pétri » (voir composition en page 2)

MATERIEL RECOMMANDE :

Vortex (*ref VORT dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
Etuve (*ref BACTERIO1 dans la partie matériel de laboratoire du catalogue*)
Caméra pour microscope (*ref 76455 ou 76457 ou 76458 dans la partie observation du catalogue)*

FICHE PREPARATEUR

1) Préparation du milieu pour les levures : mode opératoire différent selon la version choisie du kit :

- **Pour la version coulée** :

Les boîtes sont prêtes à l'emploi.
Conserver les boîtes convercle vers le bas à **+4°C**

- **Pour la version à couler** : possibilité de se servir d'un bain-marie ou d'un micro-ondes (réaliser cette étape en avance pour plus de sécurité)

- **Avec un bain-marie** :

Placer les bouteilles dans un bain-marie bouillant avec le bouchon légèrement dévissé
Surveiller l'avancée de la fonte du milieu. La totale dissolution prend environ 30 à 60 minutes (cette étape peut être beaucoup plus longue si la température du bain n'est pas suffisante)

👁👁 ATTENTION 👁👁 : manipuler avec précaution, pour éviter toute brûlure, utiliser des gants antichaleur

Laisser légèrement refroidir (attention, il ne faut couler la gélose quand elle est encore bien liquide)
Couler 16 à 17 boîtes par bouteille : 20 mL par boîte environ.
Laisser complètement refroidir
Conserver les boîtes couvercle vers le bas à 4°C

- **Avec un micro-ondes** :

Placer les bouteilles avec bouchon dévissé au micro-ondes à puissance moyenne pour éviter les projections
Contrôler l'état du milieu toutes les 30 secondes et agiter par rotation
Arrêter le chauffage lorsqu'il ne reste plus de grumeaux et que le milieu est bien homogène.
Laisser légèrement refroidir (attention, il ne faut couler la gélose quand elle est encore bien liquide)
Couler 16 à 17 boîtes par bouteille : 20 mL par boîte environ

Laisser complètement refroidir
Conserver les boîtes couvercle vers le bas à **4°C**

- **<u>Pour la version en poudre :</u>**

Dans un récipient d'au moins 2L (par exemple un bidon), verser le contenu des sachets notés « Yeast extract + pectone » et « glucose » contenus dans le sachet noté « pour milieu complet gélifié ».
Ajouter 2 L d'eau dans ce récipient
Agiter
Répartir dans 4 flacons de 500 mL en verre ou en plastique resistant à l'autoclave
Peser 10g d'agar du sachet noté agar contenu dans le sur-sachet noté « milieu complet gélifié »
Verser 10g d'agar dans chacun des 4 flacons de 500 mL
Agiter
Autoclaver 20 minutes à 120°C

👁👁 <u>ATTENTION</u> 👁👁 : manipuler avec précaution, pour éviter toute brûlure, utiliser des gants antichaleur

Laisser légèrement refroidir (attention, il ne faut couler la gélose quand elle est encore bien liquide)
Couler 100 boîtes de pétri
Laisser complètement refroidir
Conserver les boîtes couvercle vers le bas à 4°C

2) Repiquage éventuel de la souche Saccharomyces cerevisae Ade2-

a. Utilisation sous 10 jours après réception :

Utiliser les colonies telles quelles (leur pigment rouge n'a pas encore été dégradé)

b. Utilisation au-delà de 10 jours après réception :

Repiquer 5 jours avant le TP plusieurs boîtes (on n'est jamais à l'abri d'un contaminant) pour que le pigment rouge des colonies ainsi obtenues ne soit pas dégradé. Si des colonies blanches de plus grosse taille sont apparues, ce ne sont pas des contaminants mais des colonies avec une mutation au niveau de la

chaîne respiratoire (pour plus d'explications, voir pages 12 et 13) : n'utilisez pas ces colonies.

Respecter les conditions nécessaires au rougissement :

- **La température** idéale de culture de cette souche est de 28-30°C, si la température n'est pas suffisamment élevée, les colonies resteront blanches mais il ne faut pas dépasser 37°C.
- **Le temps** nécessaire au rougissement est de 4-5 jours, les colonies au départ ne sont pas pigmentées, elles rougissent seulement en fin de croissance.
- Le rougissement est un phénomène **aérobiose**, il ne faut pas parafilmer les boîtes en culture.
- Il est impératif de respecter les **concentrations cellulaires** indiquées dans notre protocole lors de la préparation des suspensions de levures. Si il y a trop de colonies sur la boîte, elles ne rougiront pas.

3) Préparation de la « suspension A » de levures Saccharomyces cerevisae Ade2- de concentration 10^6 cellules/mL

👁👁 <u>ATTENTION</u> 👁👁 : étape à ne pas préparer en avance mais juste avant le début du TP pour que les cellules n'éclatent pas

👁👁 <u>ATTENTION</u> 👁👁 : étape à réaliser en conditions de stérilité (bec bensun ou électrique ou encore hotte à flux)

<u>A . Préparation de la « suspension mère » de levure :</u>

Verser à la pipette 10 mL d'eau stérile dans un tube stérile de 10 mL
Prélever, avec un cure-dent stérile, quelques colonies de levures Ade2- isolées sur boîte de pétri
Mettre en suspension dans les 10 mL d'eau stérile
Agiter
Continuer ces étapes de prélèvement et de mise en suspension jusqu'à obtention d'une suspension trouble
Agiter énergiquement (au vortex si possible) pour rendre la suspension bien homogène
Noter ce tube « suspension mère »

<u>B. Préparation de la « suspension de comptage » : dilution d'un facteur 10 de la « suspension mère »</u>

Prélever 0,5 mL de la « suspension mère » (avec un compte-gouttes stérile contenu dans le sachet de matériel en option, 2 graduations sur la poire)
Verser dans un tube stérile de 10 mL
Ajouter 4,5 mL d'eau stérile avec une pipette stérile
Agiter
Noter ce tube « suspension de comptage »

C. Comptage :

Avec des lames KOVAS :

Prélever, avec un compte-gouttes stérile, une goutte de la « suspension de comptage » préalablement agitée
Déposer dans le coin d'une des 10 cupules de comptage

NB : par capillarité, la suspension va pénétrer sous la lamelle.

Placer la lame sous l'objectif du microscope au grossissement 400
Mettre au point
Compter les cellules présentes dans une dizaine de carrés de comptage
Faire une moyenne :

moyenne = nombre de levures sur les carrés / nombre de carrés comptés

Sachant que chaque carré contient 0,01 µL, calculer la concentration de la suspension de comptage en cellules par mL :

Concentration « suspension de comptage » en cellules/mL= moyenne x100 000

Sachant que la suspension mère a été diluée d'un facteur 10 pour obtenir la suspension de comptage, calculer la concentration de la suspension mère en cellules par mL :

Concentration « suspension mère » en cellules/mL = concentration « suspension de comptage » x 10

Il faut que cette concentration soit supérieure ou égale à 10 000 000 cellules/mL.
Si la suspension mère est moins concentrée, ré-itérer les étapes de prélèvement de colonies sur boîte et de mise en suspension. Puis réaliser à nouveau les points B et C.

🗝 Conseil 🗝: Marquer chaque cupule de comptage utilisée au marqueur indélébile afin de ne pas confondre les cupules usagées si vous utilisez la même lame la semaine suivante (travail en demi-groupe).

👁👁 ATTENTION 👁👁 : les dilutions et le comptage des cellules en vu de la préparation de la « suspension A » doivent être effectués avec soin et en conditions stériles : les concentrations des suspensions sont un élément décisif pour la réussite du TP.

D. Préparation de 50 mL de suspension de levures de concentration 10^6 cellules/mL pour le TP : « suspension A »

Prélever un volume de suspension mère calculé avec la formule suivante :

Volume V en mL de suspension mère à prélever = 50 000 000 / Concentration de la suspension mère en cellules / mL

Verser ce volume dans un tube pouvant contenir au moins 50 mL

Complèter avec un volume d'eau tel que :

Volume d'eau stérile à ajouter en mL = 50 – Volume de suspension mère prélevé

La suspension de concentration 10^6 cellules/mL obtenue sera notée « suspension A».

Répartir 2 mL de cette suspension par tube dans 10 tubes de 5 mL (1 tube par binôme soit une préparation pour 20 élèves)

Noter ces tubes « suspension A »

4) Préparation de la salle :

Préparer, en champ stérile (bec bunsen ou électrique ou hotte à flux), 1 flacon contenant 100 mL d'eau stérile.

Prévoir un compte-gouttes stérile pour la classe.
Disposer sur chaque paillasse un tube stérile de 5 mL, 2 compte-gouttes stériles, 5 boîtes de pétri de milieu complet, 1 tube contenant 2 mL de la « suspension A », 2 étaleurs stériles.

🗝 Conseils 🗝:: Afin que le matériel reste stérile, ne pas faire manipuler tous les binômes en même temps et distribuer les compte-gouttes et les étaleurs au fur et à mesure. Les élèves ayant étalé leurs solutions peuvent procéder à l'irradiation pendant que les autres commencent l'étalement.

5) Après le travail des élèves :

a. Incubation :

Incuber les 5 boîtes sans les parafilmer pendant 5 jours à 28°C (ou une semaine à température ambiante si vous ne disposez pas d'étuve), couvercle vers le bas Puis conserver à 4°C couvercle vers le bas jusqu'à la séance d'observation des résultats.

❒NB❒**:** Si un contaminant (type champignon par exemple) apparaît sur une boîte, écartez-la immédiatement pour éviter de contaminer les autres boîtes de la pile.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : Il est impératif de respecter les concentrations cellulaires indiquées dans notre protocole lors de la préparation des suspensions de levures. Si il y a trop de colonies sur la boîte, elles ne rougiront pas.

b. Nettoyage

Placer tous les instruments dans l'eau de javel (concentration = 1%) en fin de manipulation.

Vous avez muté des micro-organismes aussi une fois que les résultats ont été observés, placer les boîtes dans de l'eau de javel (concentration = 1%) ou les autoclaver.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : Ne pas toucher le milieu avec les mains et bien les lavers après manipulation (on ne contrôle jamais vraiment ce que l'on fait pousser sur milieu complet)

PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE:

A. Organisation du travail :

Les travaux pratiques se dérouleront en deux séances :
Première séance d'1h30 :

- Mise en suspension de colonies de levures prélevées sur boîte de pétri réalisée par le préparateur juste avant le TP.
- Comptage sur lame et dilution afin d'obtenir une suspension de levures de concentration connue réalisées par le préparateur juste avant le TP. Il est possible de montrer le principe de comptage aux élèves pendant la séance.

🗝 Conseil 🗝 : Il est recommandé d'utiliser une caméra reliée au microscope pour montrer aux élèves le fonctionnement d'une lame de comptage. Vous pouvez ainsi leur montrer le nombre de levures par carré de comptage pour la suspension A.

- Etalement sur milieu complet réalisé par les élèves
- Irradiation aux UV à 254 nm réalisée par le professeur ou par les élèves sous surveillance du professeur
- Mise en incubation à 28°C ou à température ambiante

Deuxième séance (la semaine suivante) :

- Observation
- Interprétation des résultats.

❒NB❒ : le matériel de l'option « matériel » ou « matériel et boîte de pétri » est prévu pour 20 binômes, soit 40 élèves. La fiche de préparation est prévue pour 10 binômes car les suspensions préparées ne peuvent pas être gardées d'une semaine à l'autre.

B. Intérêts pédagogiques :

➡ Initiation à la microbiologie : utilisation du microscope, découverte des milieux de culture, des techniques de dilution et de repiquage. Apprendre à manipuler en conditions stériles.
➡ Montrer que les caractères phénotypiques, directement liés au génotype, se transmettent de génération en génération. Approche de la **relation Génotype-Phénotype**.

➡ Etudier **l'effet mutagène des UV** sur les levures, en déduire qu'ils agissent directement sur l'ADN en introduisant des mutations : apparition de révertants, diminution du nombre de clones = **effet létal**..

C. Notions sur les levures :

Les levures se reproduisent par bourgeonnement ou plus rarement par scissiparité (cloisonnement transversal) = spécificité des Schizosaccharomyces pombe.
Les levures forment des colonies coniques sur boîte de pétri, contrairement aux bactéries qui ont plutôt tendance à former des colonies plates et aux champignons dont le mycélium est facilement reconnaissable.
Leur taille (5 à 15µm) est supérieure à celle des bactéries (1 à 3 µm), ce qui permet de les observer facilement au grossissement 400.

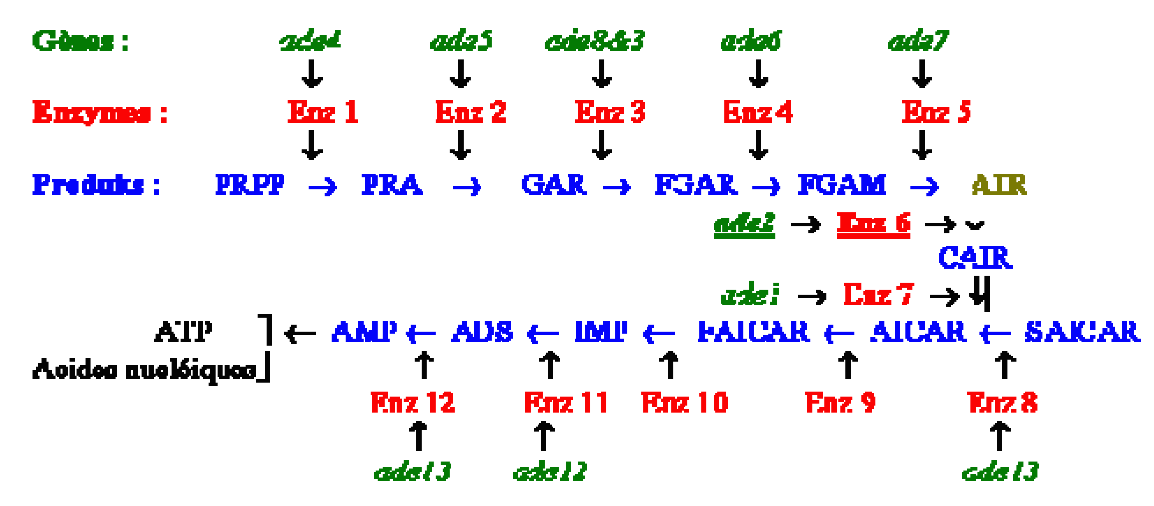
D. Notions sur la levure *Saccharomyces cerevisae* Ade2- :

Il s'agit d'un eucaryote unicellulaire haploïde.
C'est le plus petit génome eucaryote connu : 14 000 kb et 6200 gènes.
La souche utilisée porte une mutation qui affecte le gène ade2 impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine (voir le schéma en page 12).

Le gène **ade2** a pour fonction de transformer un intermédiaire de cette chaîne : l'Amino imidazole ribotide ou AIR qui est oxydé en un pigment rouge en aérobiose.
La mutation **Ade2^{-}** a deux effets :

- La souche étant incapable de synthétiser l'adénine, elle ne poussera pas sur milieu minimum sans adénine
- Si on apporte de l'adénine en supplémentant le milieu de culture (ou en faisant pousser sur milieu riche), la souche mutée va l'utiliser pour pousser. Comme la quantité d'adénine fournie à la souche n'est pas très importante, la souche n'a pas assez d'adénine pour pousser au mieux de ses capacités. La souche fera donc fonctionner la chaîne de biosynthèse de l'adénine. Elle présentera un phénotype rouge du fait de l'accumulation de l'AIR et de son oxydation.
  👁👁 ATTENTION 👁👁 : dans le cas où on donne assez d'adénine à la souche pour parer à tous ses besoins, elle ne fera plus tourner le cycle d'obtention d'adénine et ainsi, l'AIR ne s'accumulera plus et le phénotype blanc apparaîtra.

CHAINE DE BIOSYNTHESE DE L'ADENINE



PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate ; PRA : 5-phosphoribosylamine ;
GAR : glycinamide ribotide ; FGAR : formyl glycinamide ribotide ;
FGAM : formyl glycinamidine ribotide ; AIR : amino imidazole ribotide ;
CAIR : 5-amino 4-carboxyimidazole ribotide ; SAICAR : 5-amino 4-succincecarboxy imidazole ribotide ;
AICAR : 5-amino 4-carboxamide imidazole riboside ;
FAICAR : 5-amino 4-carboxamide imidazole ribotide ; IMP : inosine monophosphate.

Le phénotype rouge et l'incapacité à pousser sur milieu pauvre nous permettent de disposer d'un « crible positif » visible à l'œil nu et d'un système de sélection sans utilisation d'antibiotique. On différencie ainsi facilement les souches qui portent la mutation Ade2⁻ après croissance sur boîte de pétri.
En effet, sur boîte riche ou supplémentée en adénine, les levures sans mutation pousseront et auront un phénotype blanc, tandis que les levures Ade2- pousseront mais auront un phénotype rouge.
Sur boîte de milieu pauvre sans adénine, les levures non mutées poussent et sont blanches alors que les levures Ade2- ne poussent pas.

👁👁 <u>ATTENTION</u> 👁👁 : les mutations sont courantes chez la levure Ade2- car le pigment AIR qui s'accumule est toxique et augmente la pression de sélection. Il est courant que la levure mute spontanément au niveau de la chaîne respiratoire de manière à éviter d'oxyder l'intermédiaire de biosynthèse de l'adénine (l'AIR) en composé toxique. Ces colonies mutées sont blanches et plus grosses que les rouges car elles poussent plus facilement (non génées par le pigment toxique) : ce n'est pas pour autant qu'elles ont récupéré la capacité à synthétiser leur propre adénine.

E. Notions sur les UV : agent mutagène

Les UV utilisés sont de type C et de longueur d'onde 254 nm.
La distance optimale d'exposition est de 25 cm.

La boite d'irradiation Sordalab permet de travailler en toute sécurité et efficacité. Pour ce faire, suivez le protocole décrit dans la fiche de manipulation par les binômes (page 14)

La molécule d'ADN possède la propriété d'absorber la lumière UV à 254 nm ; les UV entraînent des mutations :
L'absorption de l'énergie des UV par l'ADN entraîne la formation de dimères de thymines adjacentes, ce qui provoque des cassures au sein de la molécule due à des distorsions de la double hélice.
Dans la majorité des cas, ces cassures vont être réparées par les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (nucléases, polymérases…). Seulement, ces enzymes peuvent commettre des erreurs et des mutations peuvent apparaître. Plus on sollicite ces enzymes, plus le risque d'apparition de mutation est important. Ces mutations peuvent être létales (si elles affectent un gène responsable de la synthèse d'une protéine vitale) ou non et, dans ce cas là, on a apparition d'un « mutant ».
La manipulation consiste à exposer notre souche mutée aux UV et à observer l'apparition de colonies blanches sur milieu supplémenté en adénine qui peuvent être issues des situations suivantes :

➨ L'introduction d'une mutation dans un gène en amont d'ade2 dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine empêche l'accumulation de l'AIR : c'est un **révertant**.
➨ L'introduction d'une seconde mutation dans le gène ade2 peut rétablir sa fonction, dans ce cas la levure peut à nouveau synthétiser l'adénine et n'accumule plus l'AIR, donc sera blanche : on dit qu'on a un **révertant vrai**, celui-ci poussera alors sur milieu minimum.
➨ L'introduction d'une mutation dans un gène impliqué dans la chaîne respiratoire empêche la transformation de l'AIR en pigment rouge, car c'est un phénomène aérobiose.

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES :

A. CONSIGNES GENERALES POUR LE TP :

👁👁 ATTENTION 👁👁, pour votre sécurité et la réussite de l'expérience, respecter bien les conditions de travail suivantes :

- Ne pas toucher le milieu des boîtes de pétri avec les mains et bien les laver en fin de séance : on ne contrôle jamais totalement ce que l'ont fait pousser sur un milieu complet…
- Toujours agiter une suspension de levures avant d'en prélever car les levures sédimentent rapidement
- Prendre l'habitude de noter au marqueur indélébile le contenu des boîtes et les initiales du binôme qui a manipulé
- Ne pas contaminer l'espèce étudiée avec des souches externes et ne pas polluer l'environnement avec les expériences menées sur la souche étudiée :
  - Nettoyer la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
  - Passer les mains à l'alcool
  - Porter une blouse en coton
  - Travailler dans une zone de stérilité lors de la manipulation des levures, des milieux et instruments stériles :
    - Dans un diamètre de 35 cm autour de la flamme d'un bec bensun, ou
    - Dans le diamètre recommandé par le contructeur d'un bec électrique, ou
    - Dans un diamètre de 25-30 cm autour d'une lampe à alcool, ou
    - Dans la zone de stérilité d'une hotte à flux
  - Eviter les mouvements brusques et de parler devant les boîtes ouvertes
  - Utiliser des instruments et des milieux stérilisés
  - Placer les pipettes souillées dans un pot de javel

👁👁 ATTENTION 👁👁 : une fois qu'un instrument ou un milieu stérile est entré en contact avec une cellule, le sol, une main, le col d'un tube, une solution… , il est contaminé.

B. MANIPULATION :

Le matériel des options « matériel » ou « matériel et boîtes » permet de travailler en demi-groupe.

1) **Préparation pour tout le groupe (10 manipulations) de la « suspension B » de concentration 10^3 levures / mL à partir de la « suspension A » de concentration 10^6 levures / mL.**

Déposer, avec le compte-goutte, 0,1 mL (2 gouttes) de « suspension A » dans 100 mL d'eau stérile.
Noter ce flacon « suspension B »
Répartir, dans chacun des 10 tubes de 5 mL, 2 mL de la « suspension B »
Noter ces tubes « suspension B »
Chaque binôme dispose d'un tube de « suspension B ».

❒NB❒ : cette étape peut être réalisée par l'enseignant si celui-ci pense qu'elle est source de contamination quand les élèves le font eux-même. Cette étape peut être commune à toute la classe si le professeur veut utiliser moins de tube.

2) **Etalement des suspensions de levure sur la gélose des boîtes de pétri :**

Verser avec un compte-gouttes stériles, 0,1 ml (2 gouttes) de la « suspension B » préparée au point 1) sur une boîte de milieu.
Etaler immédiatement avec un étaleur stérile d'un mouvement circulaire et répété, afin de répartir le mieux possible le liquide sur le milieu.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : ne pas soulever la gélose lors de l'étalement

Noter cette boîte t = 0 : elle ne sera pas exposée aux UV
Penser à également indiquer le numéro ou les initiales du binôme pour retrouver la boîte facilement

Déposer, avec un autre compte-gouttes stérile, 0,1 mL de la « suspension A » préalablement agitée sur les 4 autres boîtes de milieu, puis étaler immédiatement avec l'autre étaleur stérile comme décrit ci-dessus.
Noter les boîtes t = 15, t = 30 ; t = 60 ; t = 120
Noter également le nom du binôme
Les boîtes sont alors prêtes à être irradiées.

3) Irradiation des boîtes notées t = 15, t = 30 , t = 60 et t = 120 aux UV C

❒NB❒ : les autres types d'UV ne donneront pas des résultats satisfaisants. Le type d'UV est noté sur le tube.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : Les UV C sont dangereux et les cellules irradiées sont sujettes à l'apparition de mutations : l'ADN des cellules exposées peut être cassé et déformé.

a. Respecter les consignes de sécurité :

Si vous n'utilisez pas notre boîte à irradiation, nous vous conseillons de porter gants, blouse et lunettes protectrices dès l'approche de la zone d'irradiation afin que la manipulation soit sans aucun risque.

Si vous utilisez notre boîte d'irradiation, suivez les consignes de sécurité suivantes :

- ☑ Eteindre la lampe avant d'ouvrir la porte
- ☑ Vérifier que la porte est bien fermée avant d'allumer la lampe
- ☑ Vérifier le positionnement de la bavette transparente (qui permet de stopper les UV qui pourraient s'échapper) avant chaque période d'irradiation
- ☑ Ne pas laisser les élèves manipuler seuls la boîte à UV

❒NB❒ : le port de gants et de lunettes n'est pas nécessaire lors de l'utilisation de notre lampe si les conditions de sécurité ci-dessus sont bien respectées.

b. Suivre le mode d'emploi de la boîte à irradiation :

La boîte à irradiation Sordalab est livrée avec un mode d'emploi qui est repris ci-dessous :

- Allumer la boîte 30 minutes avant le début de l'irradiation (ceci permet de créer une atmosphère stérile dans la boîte)
- Eteindre la lampe
- Introduire les boîtes de pétri (maximum 8 à la fois…) gélose vers le haut
- Enlever le couvercle des boîtes (Il est conseillé de laisser les couvercles à l'intérieur pour qu'ils restent dans des conditions de stérilité)
- Fermer soigneusement la porte battante

- Allumer la lampe
- Lancer le chronomètre une fois la lampe allumée

Laisser 15 secondes les boîtes notées t = 15
Laisser 30 secondes les boîtes notées t = 30
Laisser 60 secondes les boîtes notées t = 60
Laisser 120 secondes les boîtes notées t = 120

- Eteindre la lampe
- Replacer les couvercles et récupérer les boîtes de pétri
- Refermer la boîte d'irradiation

🗝 Conseil 🗝 : Les élèves qui ne sont pas occupés à l'irradiation peuvent observer les levures au microscope

4) Incubation des boîtes

Incuber les 5 boîtes pendant 5 jours à 28°C (ou une semaine à température ambiante si vous ne disposez pas d'étuve), couvercle vers le bas
Puis conserver à 4°C couvercle vers le bas jusqu'à la séance d'observation des résultats.

❒NB❒ : Si un contaminant (type champignon par exemple) apparaît sur une boîte, écartez-la immédiatement pour éviter de contaminer les autres boîtes de la pile.

INTERPRETATIONS ET CONCLUSIONS

Exemple de résultat obtenu :

Temps d'exposition	**Nombre total de clones**	**Nombre de clones blancs**	**%age de blancs**
0 seconde	31 x 100 = 3 100	0	0
15 secondes	1 700	13	0,7
30 secondes	520	7	1,34
60 secondes	40	3	7,5
120 secondes	7	1	14

NB : Il faut multiplier le nombre de colonies par 100 pour la boîte non irradiée pour pouvoir comparer les résultats à ceux des autres boîtes : la suspension « B » étalée sur la boîte « t = 0 » est 100 fois moins concentrée que la suspension « A » étalée sur les boîtes irradiées. Précisez bien aux élèves que cette dilution sur la boîte « t = 0 » a été faite pour les aider à compter les colonies plus facilement.

Quelques raisons d'echec et actions correctives :

- Les levures en suspension dans l'eau peuvent éclater sous l'effet de la pression osmotique, il est conseillé de ne pas préparer les suspensions la veille du TP mais juste avant la manipulation.
- Lors de l'interprétation des résultats, des colonies de levures sont roses et non rouges. Elles doivent être considérées comme rouges, ces levures n'ont pas suffisamment " lancé " leur chaîne de biosynthèse de l'adénine et accumulé peu d'AIR.
- Les lames de comptage sont impératives pour la préparation de la suspension cellulaire car une mauvaise concentration peut fausser les résultats finaux. En effet, s'il y a trop de levures sur la boîte de pétri, le rougissement est moins évident car les différentes colonies doivent se partager les constituants du milieu.
- Eviter la culture à 37°C et plus car la levure Ade2- présente un comportement thermosensible et peut ne pas bien rougir au delà de cette température.
- Après plus de 10 jours au réfrigérateur, les levures rouges ont tendance à blanchir (probablement par dégradation du pigment), tenez compte de ce paramètre !

Observations à mener :

➔ Tout d'abord, il est important de remarquer que la boîte t = 0 (non soumise à l'action des UV) présente des colonies de levures isolées qui ont toutes un phénotype rouge.

□NB□ : Si vous voulez faire des rapport entre les nombres de colonies des différentes boîtes, pensez que la boîte t = 0 a été ensemencée avec une suspension 100 fois moins concentrée que la suspension d'ensemencement des autres boîtes. Il faut donc multiplier le nombre de colonies de la boîte t = 0 pour le comparer à ceux des autres boîtes.

Cela permet de démontrer que les caractères phénotypiques se transmettent de génération en génération puisqu'ils sont directement liés au génotype.

□NB□ : S'il y a des colonies blanches sur la boîte t = 0, soit cela est dû à une contamination durant l'expérience (en particulier si le nombre de colonies blanches est élevé), soit les conditions de rougissement n'ont pas été respectées (concentration trop élevée, température non respectée, conservation trop longtemps…) , soit il est possible que ces colonies blanches apparaissent par réversion spontanée. En effet, toutes les souches Ade2- présentent un taux de réversion spontanée plus ou moins élevé ; la souche sélectionnée possède un faible taux de réversion mais des colonies blanches peuvent tout de même apparaître.

➔ Ensuite il est important de remarquer que le nombre de colonies diminue progressivement des boîtes t = 15 à t =120. Cela nous permet de constater que les UV ont un effet létal « dose-dépendant » sur les levures.

Dans le cas où cet effet létal ne serait pas évident, il est possible que ça soit dû à une suspension de levures préparée trop en avance ou à la mauvaise concentration ou bien à la lampe à UV. Vous pouvez la tester en exposant une boîte de pétri de levures pendant 3 minutes : après incubation, vous devez observer un effet létal total. Dans le cas où ce n'est pas le cas, la lampe ne fonctionne pas aux UV C ou alors sa puissance n'est pas suffisante (recommandation : 6 W).

➔ Puis on s'intéresse finalement à l'apparition de « révertants blancs » sur les boîtes t = 15 à t = 120. Logiquement des colonies blanches sont censées apparaître sur les 4 boîtes ; si ce n'est pas le cas, c'est simplement le fait du

hasard : les mutations engendrées par les UV n'ont pas touché de gènes impliqués dans ce phénomène de pigmentation.

Trois types de mutations peuvent entraîner le retour à un phénomène blanc :
1) L'introduction d'une mutation dans un gène en amont d'ade2 dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine implique, si cette mutation supprime la fonction du gène touche, que l'AIR ne peut plus être synthétisé, donc ne s'accumule pas.
2) Moins probable, l'introduction d'une seconde mutation dans le gène ade2 peut rétablir la fonction et ainsi l'AIR est transformé, donc ne s'accumule plus. Dans ce cas là, les levures peuvent pousser sur milieu minimum.
3) Une mutation dans un gène vital pour la respiration empêche la formation du pigment rouge car c'est un phénomène qui se produit en aérobiose.

□NB□ **:** Si au moment de l'étalement l'élève traverse la gélose avec son étaleur, les levures qui vont se développer sous la gélose seront blanches car la formation du pigment rouge est un phénomène aérobie.

Références Internet :
http://wwwusers.imaginet.fr/~pol
Se rendre dans le manuel de travaux pratiques virtuel.

Références bibliographiques :
« Travaux pratiques de Biologie des levures » de Didier POL Editions Ellipses.

FICHE SECURITE

Il faut respecter les conditions de sécurité propre aux UV.
La mutagenèse et l'utilisation d'un milieu complet sont des manipulations qui doivent se faire dans des conditions de sécurité pour que les mutants et les contaminants qui peuvent coloniser la boîte ne se répandent pas : il faut plonger les boîtes dans de la javel (concentration 1%) ou de l'eau oxygénée pour tuer tous les germes et bien se laver les mains.

FICHE CONSERVATION

Quelque soit la version du kit,
La boîte de pétri notée « Y » contenant les colonies de la souche se conserve pendant 2 semaines à **+ 4°C**. Mais un repiquage est nécessaire 5 jours avant le TP pour avoir de bons résultats.

Pour la version en poudre,
Le contenu des petits sachets du sur-sachet noté « milieu complet gélifié » se conserve pendant 1 an à **température ambiante**
Pour la version à couler,
Le contenu des bouteilles se conserve pendant 1 an à **température ambiante**
Pour la version coulée en boîte, les boîtes de pétri se conservent couvercle vers le bas pendant 1 mois **à +4°C**

FICHE TRI ET RECUPERATION

La gélose des boîtes doit être décontaminée des éventuels contaminants et des mutants avec de la javel (concentration 1%) ou de l'eau oxygénée puis jetée à la poubelle.
Les boîtes de pétri ayant contenu la gélose peuvent être jetées dans les bacs de récupération du plastique après avoir bien été décontaminées.

ATTENTION : on ne contrôle jamais totalement ce qui pousse sur milieu complet, la décontamination est obligatoire.